Untersuchungen über das Vorkommen von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut, nebst Bemerkungen über den mikrochemischen Nachweis der Eiweisskörper.

Von Fridolin Krasser.

(Arbeiten des pflanzenphysiologischen Institutes der k. k. Wiener Universität. XXXIV.)

Einleitung.

Vorliegende Arbeit schliesst sich an Wiesner's „Untersuchungen über die Organisation der vegetabilischen Zellhaut" [1] unmittelbar an.

Wiesner hat in der citirten Abhandlung im Gegensatze zu seinen Vorgängern gezeigt, dass die Wand als lebendes Glied der Zelle zu betrachten ist. Nach seinen Darlegungen enthält die Zellhaut, zum mindesten so lange sie wächst, Protoplasma. Dieses Dermatoplasma ist in erster Linie bei den Wachsthums- und überhaupt Lebensvorgängen der Wand betheiligt.

Diese Grundauffassung über die Natur der vegetabilischen Zellhaut führte Wiesner nothwendigerweise zu einer von der herrschenden abweichenden Ansicht bezüglich des Chemismus der Zellwand.

Man hatte bisher die Cellulose als das zuerst entstehende chemische Individuum der Zellhaut angesehen und angenommen, dass — abgesehen von den Infiltrationsproducten — alle anderen in der Zellhaut auftretenden chemischen Individuen Abkömmlinge der Cellulose seien.

---

[1] Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl., XCIII. Bd., I. Abth., Jännerheft, Jahrg. 1886.

Diese Ansicht ist mit Rücksicht auf die Zahl und Arten der derzeit schon in der Zellhaut nachgewiesenen Stoffe unhaltbar geworden.

Wiesner betrachtet die Eiweisssubstanzen des Dermatoplasmas als jene Stoffe, aus welchen die übrigen Zellwandkörper direct oder indirect hervorgehen.

Der genannte Forscher hat in seiner oben citirten Abhandlung nur einige Fälle der Anwesenheit des Eiweiss in der Zellmembram angeführt und darauf hingewiesen, dass in einer späteren Publication die genaueren Nachweise nach dieser Richtung geliefert werden sollen.[1]

Herr Professor Wiesner hat mich mit der Ausführung dieser Untersuchung betraut, deren Resultate in den nachfolgenden Blättern verzeichnet sind. Ich kann es mir nicht versagen, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer Herrn Professor Wiesner hiefür sowohl als auch für das lebhafte Interesse, mit dem er diese bescheidene Arbeit begleitete und förderte, innigsten Dank zu sagen.

Ich habe auf Anregung des Herrn Professor Wiesner mich zunächst damit beschäftigt, den immer noch sehr mangelhaften mikrochemischen Nachweis des Eiweiss möglichst sicher zu gestalten. Diesem Gegenstand ist der erste Theil vorliegender Arbeit gewidmet, während der zweite sich mit dem Nachweis der Eiweisssubstanz in der vegetabilischen Zellwand beschäftigt.

I.

a) Die Xanthoproteïnsäurereaction.

Über die Natur des Productes, welches durch Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweisskörper entsteht, hat Mulder[2] die ersten genauen Untersuchungen angestellt.

Die folgenden Mittheilungen über dieses Product (Xanthoproteïnsäure) stützen sich auf jene Zusammenstellung, welche Mulder auf Berzelius' Wunsch für dessen Lehrbuch der Chemie selbst besorgte.

---

[1] l. c., p. 43., Sep. Abdr.

[2] Journal f. prakt. Chemie, XVI. Bd. p. 297. 1839.

Die rein dargestellte Xanthoproteïnsäure ist ein orangegelbes Pulver, welches unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, löslich in überschüssiger HNO_3 (daraus durch Wasser in Gestalt der citrongelben Verbindung fällbar) ist. Auch Salzsäure löst es, und zwar mit gelber Farbe.

Concentrirte Schwefelsäure löst die Xanthoproteïnsäure bei gelindem Erwärmen zu einer gelatinösen schön rothen Masse auf. Mit Alkalien verbindet sich die Xanthoproteïnsäure zu neutralen Salzen, deren Auflösung dunkelroth ist.

Durch Van der Prant's[1] Untersuchungen wurden Mulder's Resultate bestätigt und verallgemeinert.

Bei der mikrochemischen Anwendung pflegt man bekanntlich nach dem Vorgange Mulder's, dadurch, dass man nach der Behandlung des betreffenden Objectes mit HNO_3 auf dasselbe NH_3 einwirken lässt, die Bildung des xanthoproteïnsauren Ammonsalzes zu bewirken, um die Färbung zu verstärken. Es handelt sich nun erstlich darum, zu entscheiden, ob alle Eiweisskörper, sodann ob auch andere Körper durch HNO_3 oder HNO_3 und NH_3 gelb gefärbt werden.

Hexagonales und octaedrisches Rhodospermin zeigen die Xanthoproteïnsäurereaction erst auf Zusatz von Ammoniak[2]. Ich beobachtete, dass auch Fibrin, wenigstens das aus Maiskörnern dargestellte, die Gelbfärbung mit HNO_3 nur äusserst schwach zeigte. Die Färbung reichte nicht hin, um unter Mikroskop wahrnehmbar zu sein. Hingegen zeigte Tyrosin, also ein Spaltungsproduct der Eiweisskörper mit HNO_3 intensive Gelbfärbung. Auf Ammoniakzusatz wird das gelbe Product typisch orangefarben. Dieses Verhalten stimmt vollständig mit dem der Xanthoproteïnsäure überein. Nach O. Nasse[3] unterliegt es keinem Zweifel, dass die Xanthoproteïnsäurereaction der Eiweisskörper in einer Nitrirung derselben besteht. Ebenso leicht nitrirbar sind ganz allgemein die hydroxylirten Benzolderivate. Speciell auf die

---

[1] Jahresb. u. d. Fortschr. d. Chemie (Giessen), 2. Bd., 1849, p. 507.

[2] Die Literatur bei Behrens „Hilfsbuch bei mikrosk. Untersuchungen", 1883, p. 331.

[3] O. Nasse, „Über die aromatische Gruppe im Eiweissmolekül" in Bericht u. d. Sitzungen. der Naturf. Ges. zu Halle im Jahre 1879.

leichte Nitrirbarkeit des Tyrosins wurde zuerst von Scherer[1] aufmerksam gemacht. Es dürfte daher nicht unwahrscheinlich sein, dass Tyrosin mit HNO_3 behandelt Xanthoproteïnsäure oder doch einen derselben nahestehenden Körper liefert. Jedenfalls muss der Mikroskopiker auf dieses Verhalten Rücksicht nehmen. Auch gewisse Harze und Alkaloide nehmen, mit HNO_3 behandelt, leicht Gelbfärbung an, oder geben eine gelbe Lösung.

Nach den Untersuchungen F. Hofmeister's[2] soll ein Gewichtstheil Albuminstoff durch concentrirte HNO_3 noch in 20.000 Theilen Lösung erkennbar sein. Dass dies aber nicht für alle Albuminstoffe gilt, folgt unmittelbar aus den oben bezüglich Rhodospermin und Maisfibrin mitgetheilten Thatsachen. Bei der mikrochemischen Anwendung der Xanthoproteïnsäurereaction reducirt sich naturgemäss durch Anwendung des Mikroskopes die Wahrnehmbarkeit.

Mit Hilfe der HNO_3 kann man Eiweiss mikrochemisch an Pflanzenschnitten um so weniger sicher nachweisen, als die Eigenschaften der rein dargestellten „Xanthoproteïnsäure" sich nicht recht verwerthen lassen. Fügt man z. B. ein Alkali (Ammoniak, Kalilauge) hinzu, so wird keine dunkelrothe Auflösung erzielt, sondern die Gelbfärbung schlägt selbst bei reinen Eiweisskörpern nur in eine intensivere Gelb- bis Orangefärbung um. Zudem ist bei Anwendung von Alkalien zu berücksichtigen, dass viele organische Substanzen, die keineswegs Eiweisskörper sind, dadurch gelb werden. Die Controlprobe mit concentrirter H_2SO_4 (Umwandlung der reinen Xanthoproteïnsäure in eine schön rothe Masse) kann aus naheliegenden Gründen bei pflanzlichen Objecten keine Anwendung finden. Man vergleiche die später folgenden, an die Raspail'sche Reaction geknüpften Erörterungen.

Colin's[3] Angabe, dass man durch Behandlung des Eiweiss mit HNO_3 ein Farbenspiel von roth und blau hervorbringen könne, kann ich nicht bestätigen.

---

[1] Journal f. prakt. Chem., LXX., p. 406, 1857.

[2] Hoppe-Seyler, Handb. d. phys. path. chem. Analyse., 5. Aufl., p. 263., 1883.

[3] Annales de Chimie et de Physique, XXX., p. 323, 1826.

b) Die Reaction mit Salzsäure.

Bourdois und Caventou[1] machten die ersten Beobachtungen über die durch Salzsäure hervorgerufene Reaction thierischer Eiweissstoffe. Vauquelin, Runge[2], Bonastre[3] beobachteten Färbung mit Salzsäure an eiweisshältigen Pflanzentheilen.

Die ersten genaueren Angaben über die Reaction mit Salzsäure verdanken wir Mulder[4], welcher constatirte, dass die blaue Lösung bei Albumin immer ein wenig ins purpurfarbene zieht, während sie von Fibrin rein und schön dunkelblau ist.

Die chemische Natur des blauen Farbstoffes hat Mulder zwar nicht untersucht, aber er hat erwiesen, dass der Sauerstoff der Luft bei seiner Bildung betheiligt ist.

Mulder war auch der erste, welcher die in Rede stehende Reaction mikrochemisch zu verwerthen suchte. Er beobachtete bei vielen Pflanzen, dass die Zellwände nach mehrstündiger Behandlung mit HCl an der Luft violett gefärbt werden. Diese Reaction hielt er für eine Eiweissreaction. Auf seine Folgerungen wird später zurückzukommen sein. An dieser Stelle sei nur bemerkt, dass wir bekanntlich heute auf Grund der Entdeckungen Wiesner's wissen, dass verholzte Zellhäute in Folge des in denselben enthaltenen Vanillins bei gleichzeitiger Gegenwart von dem in den Zellwänden nicht selten vorhandenen Phloroglucin (oder Resorcin, oder Brenzkatechin) durch HCl violett gefärbt werden.

Auch von Ritthausen[5] und Sachsse[6] wurde das Verhalten verschiedener Eiweisskörper gegen HCl näher verfolgt. Gluten-Caseïn quillt in concentrirtem HCl zunächst nur zu schleimigen, schwarzbraunen Flocken auf, löst sich aber dann klar mit brauner Farbe und einem Stich ins Violette.

---

[1] Berzelius, Jahresber. (deutsch v. Wöhler), VII. Jahrg., p. 296, 1828.

[2] Jahrb. d. Chem. u. Ph., 1828, III. Bd., p. 115.

[3] Journ. de Chemie medic., IV. Bd., p. 319.

[4] Berzelius Jahresber. (deutsch v. Wöhler), 1840, p. 649.

[5] Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Ölsamen. Bonn, 1872.

[6] Sachsse, Die Farbstoffe etc. §. 59.

Das Mucedin der Gerste gibt in der Kälte eine röthlichbraune, beim Kochen mit HCl eine tiefrothe Lösung, das Maisfibrin erzeugt eine schwach bräunlich gefärbte Lösung.

Die Lösung des Haferleims in HCl ist farblos, die des Bohnenlegumins braun, die des Gliadins bläulich mit deutlichem Schimmer von Braun.

Ich muss noch hervorheben, dass die Farbe der Lösung auch abhängig ist von der Menge der Säure und der Temperatur.

Die Färbung der Eiweisskörper mit Salzsäure tritt unter + 7° überhaupt nicht auf. Die schönste blauviolette Auflösung habe ich von Vitellin (dargestellt aus Samen von Cucurbita Pepo) erhalten. Nach tagelangem Stehen trat jedoch auch hier Verfärbung ein, ein Farbenumschlag ins Braune.

Bringt man von den Lösungen, und seien sie auch noch so intensiv gefärbt, etwas unter's Mikroskop, so wird man finden, dass die Farbenintensität nicht ausreichend ist. Die Lösungen erscheinen farblos.

Imprägnirt man Baumwolle oder Leinenfaser mit Eiweisslösung und führt dann auf dem Objectträger die Reaction aus, so gelangt man zu demselben Resultate.

Desgleichen, wenn man mit einem festen Eiweisskörper, z. B. dem leicht krystallinisch zu erhaltenden Vitellin auf dem Objectträger reagirt.

Die Reaction mit Salzsäure ist demnach schon ihrer zu geringen Farbenintensität halber mikrochemisch nicht anwendbar.

Was das Wesen der Reaction anbelangt, so sei darauf verwiesen, dass auch eines der Spaltungsproducte des Eiweiss, nämlich das Skatol, mit HCl erwärmt Violettfärbung annimmt, allerdings auch mit verdünnter HNO_3. Tyrosin und die übrigen wichtigeren Spaltungsproducte zeigen mit HCl keine Violettfärbung, oder vielmehr keine Färbung.

Es scheint demzufolge die Annahme nicht ganz unberechtigt, dass im Molecül des Skatols möglicherweise jene Atomgruppe des Eiweissmolecüles wieder erscheint, welche bei der Farbenreaction mit Salzsäure in Action tritt. Die freilich noch angezweifelte Structurformel des Skatol = β Methylindol ist die folgende:

$$C_6H_4 \begin{cases} C(CH_3):CH \\ NH \end{cases}$$

c) Die Raspail'sche Reaction.

Diese Reaction wurde unter dem Mikroskop und zwar im Jahre 1833 von Raspail entdeckt.[1] Derselbe lehrt mit Hilfe der concentrirten Schwefelsäure selbst geringe Mengen von Zucker, Eiweiss, Öl, Gummi, Harz erkennen.[2]

Um ein dauerhaftes Reagens[3] auf Eiweiss und Öl herzustellen, genügt es eine geringe Menge gepulverten Rohrzuckers in concentrirte Schwefelsäure einzutragen. Heutzutage pflegt man bekanntlich auf das betreffende Präparat zuerst möglichst concentrirte Zuckerlösung und dann Schwefelsäure einwirken zu lassen. Die concentrirte Zuckerlösung scheint für diesen Zweck zuerst von M. S. Schulze angewendet worden zu sein.

Raspail kannte bereits die Thatsache, dass sowohl Eiweiss als Öl (also gewisse Fette) durch Schwefelsäure und Zucker purpurn gefärbt werden.

Die Angaben über die bei der Raspail'schen Reaction der Eiweisskörper auftretende Färbung differiren. Nach Raspail ist sie purpurn, nach Schulze violettroth, nach Brücke schön roth.

Alle diese Angaben haben ihre Berechtigung, denn der Farbenton ist in hohem Grade von Concentration und Menge der angewandten Zuckerlösung und Schwefelsäure abhängig.[4]

Die Reaction gelingt nicht mit allen Eiweisskörpern.

Ich erhielt bei Vitellin eine ausgesprochene Lilafärbung. Ich wandte sowohl Vitellin an, das ich mir selbst aus Samen von Cucurbita Pepo dargestellt hatte, als solches, wie es aus den chemischen Fabriken in den Handel kommt. Bei Albumin (aus *Zea mais*), Fibrin (aus *Zea mais*), Legumin (aus *Vicia Faba*) war

---

[1] Nouveau Système de Chimie organique. Paris, 1833.

[2] l. c. Abs. 682.

[3] l. c. Abs. 683, Anm.

[4] Eine ähnliche Färbung wie bei der Raspail'schen Reaction erhält man bei Pettenkofer's Gallenprobe, nicht nur mit Galle als solcher, sondern auch mit Glycocholsäure, Taurocholsäure und Cholalsäure. Der bei der Pettenkofer'schen Gallenprobe mit Schwefelsäure und Zucker entstehende Körper ist jedoch durch ein specifisches Spectrum ausgezeichnet. — M. S. Schulze (Ann. d. Chem. u. Pharm., LXXI. Bd., pag. 266) fand, dass auch Elaïn eine ganz ähnliche Färbung wie Galle mit Zucker und Schwefelsäure liefert.

die Färbung violettroth, am intensivsten beim Legumin. Hexagonales und octaedrisches Rhodospermin geben die Raspail'sche Reaction überhaupt nicht.

Im Eiweissmolecül ist, wie wir aus den Zersetzungsproducten der Eiweisskörper erkennen können, ein aromatischer Kern vorhanden. Versetzen wir Proben von Tyrosin, Leucin, Xanthin, Asparaginsäure, Phenol mit Zuckerlösung und Schwefelsäure, so werden wir das Auftreten einer Rothfärbung nur bei Tyrosin und Phenol beobachten. Beim Phenol geht man am besten folgendermassen vor. Man nimmt wenig Phenollösung, versetzt mit etwas Zuckerlösung und fügt Schwefelsäure tropfenweise bis zum Auftreten der violettrothen Färbung zu. Gebraucht man diese Vorsicht nicht, so wird man häufig eine braunrothe Färbung erhalten. Auf Wasserzusatz erhält man dann allerdings auch einen rothvioletten Niederschlag.

Die Formeln von Tyrosin und Phenol lassen uns im Vergleich mit den Formeln von Leucin, Xanthin und Asparaginsäure erkennen, dass das Vorhandensein des aromatischen Kerns eine von den Bedingungen ist, welche die rothe Farbenreaction mit Zucker und H_2SO_4 erheischt. Der aromatische Kern von Tyrosin und Phenol ist aber hervorgegangen aus ähnlichen Atomgruppen des Eiweissmolecüls bei dessen Spaltung durch künstliche Sprengung oder Fäulniss. Es kann also auch das Eiweiss vermöge seines ähnlichen aromatischen Kernes dieselbe Farbenreaction geben. Noch wahrscheinlicher wird diese Ansicht, wenn es gelingt zu zeigen, dass das Product der Einwirkung von Zucker und H_2SO_4 auf Phenol, respective Tyrosin einerseits und Eiweiss anderseits sich gegen gleiche Reagentien gleich verhält.

Dies trifft in der That zu.

Phenol. Die auf Zusatz (in der oben angedeuteten Weise) von Zucker und concentrirter H_2SO_4 entstandene rothviolette Färbung wird auf Zusatz von HNO_3 blutroth, setzt man statt HNO_3 jedoch KOH oder NH_3 hinzu, so schlägt die rothviolette Färbung in Weingelb um.

Eiweiss verhält sich ebenso.

Fragen wir uns nun weiter, ob auch andere Körper mit aromatischem Kern nach der Behandlung mit Zucker und concentrirter H_2SO_4 eine Farbenreaction geben. Bekanntlich bestehen

zwei der besten Zuckerreactionen,[1] die gegenwärtig bekannt sind, in der Anwendung von α-Naphtol und concentrirter H_2SO_4, respective Thymol und concentrirter H_2SO_4.

Wenden wir dieselben in der Art an, dass wir α-Naphtol, respective Thymol mit Zucker und concentrirter H_2SO_4 versetzen, so erhalten wir selbstverständlich dieselben Reactionen.

α-Naphtol + Zucker + concentrirter H_2SO_4 violetter Niederschlag
Thymol „ „ zinnober-rubin-carminrother Niederschlag.

Molisch[2] führt noch andere Körper der aromatischen Reihe an, die mit Zucker und H_2SO_4 eigenartige Färbungen geben.

Es wurde somit gezeigt, dass eine ganze Reihe von aromatischen Körpern existirt, welche mit Zucker und H_2SO_4 Farbenreactionen geben. Da nun die aromatischen Körper Tyrosin und Phenol, welche Spaltungsproducte der Eiweisskörper sind, ebenfalls mit Zucker und H_2SO_4 eine Farbenreaction geben, und diese mit der des Eiweiss übereinstimmt, so darf man annehmen, dass in allen genannten Fällen ähnliche Atomgruppen in Action treten. Dass dies vor allem für den aromatischen Kern der Eiweisskörper gilt, geht wohl besonders aus der Thatsache hervor, dass die nicht aromatischen Spaltungsproducte des Eiweiss mit Zucker und H_2SO_4 keine Farbenreaction geben.

Es sei hier darauf hingewiesen, dass die Eiweisskörper im Organismus häufig neben Zucker vorkommen.

Dann erhält man natürlich schon durch H_2SO_4 allein die Raspail'sche Reaction. Desgleichen, wenn Körper vorhanden sind, welche unter dem Einflusse von H_2SO_4 entweder verzuckert (Kohlehydrate) werden oder Zucker abspalten (Glycoside). Pflanzliche Objecte werden zumeist auf blossen Zusatz von H_2SO_4 die Raspail'sche Reaction zeigen, da Kohlehydrate (wenigstens in Form von Cellulose und Stärke) selten fehlen werden.

Bei der mikrochemischen Anwendung der Raspail'schen Reaction darf nicht übersehen werden, dass gewisse organische Körper durch H_2SO_4 allein eine ganz ähnliche Färbung, wie sie

---

[1] Hans Molisch, „Zwei neue Zuckerreactionen", Sitzber. d. kais. Akad. d. Wiss. zu Wien, m. n. Cl., XCIII. Bd., 1886 (Mai).

[2] Molisch, l. c. pag. 915 (Sep. Abdr., pag. 4), Anm. 2.

hier in Betracht kömmt, annehmen. Es sind dies vornehmlich Glycoside und Alkaloide, z. B. Salicin, Coniferin, Narcotin, Veratrin. Das Phenolaldehyd Vanillin gibt mit Zuckerlösung und H_2SO_4 intensive Färbung nach Art der Raspail'schen Reaction, durch H_2SO_4 allein wird es rothbraun. Ferner können, namentlich bei der mikrochemischen Untersuchung von Zellmembranen, die Farbenreactionen, welche gewisse Phenole in Verbindung mit dem in „versetzten" Membranen nie fehlenden Vanillin schon auf die Einwirkung der H_2SO_4 hin geben,[1] Täuschungen veranlassen.

Beobachtet man unter Mikroskop auf Zusatz von Zuckerlösung und concentrirter H_2SO_4 Rothfärbung, so ist nur dann erlaubt diese auf Eiweisskörper zu deuten, wenn alle im Vorhergehenden berührten Körper, welche unter gleichen Bedingungen und jene, welche schon auf Zusatz von H_2SO_4 allein Rothfärbung verursachen, ausgeschlossen sind. Dass selbst bei rein dargestellten Eiweisskörpern der Farbenton der Raspail'schen Reaction nicht immer violettroth ist, wurde bereits früher hervorgehoben. Es erübrigt noch zu erörtern, worauf die von Raspail[2] beobachtete Rothfärbung von Gummi durch Zucker und Schwefelsäure zurückzuführen ist. Nach meiner Meinung kann es seit Wiesner's[3] Entdeckung des Gummifermentes nicht dem geringsten Zweifel unterliegen, dass bei den Gummiarten die Raspail'sche Reaction auf Eiweisskörper zurückzuführen ist, um so mehr als sich auch N durch die Natriumprobe in den betreffenden Körper, z. B. im arabischen Gummi nachweisen lässt.

d) Das Millon'sche Reagens.

E. Millon hat das nach ihm benannte Reagens im Jahre 1849 bekannt gemacht und die Methode der Darstellung und die Wirkungsweise desselben angegeben.[4] Modificationen der

---

[1] Wiesner, Elem. d. Anat. u. Phys. Note „Holzsubstanz", auf pag. 291, II. Aufl., 1885.

[2] Raspail l. c. Absatz 682,

[3] Wiesner in Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss. zu Wien, XCII. Bd., pag. 43, 1885, (Juli).

[4] Comptes rendus, XXVIII. Bd., pag. 40, 1849, ferner Annales de Chim. et de Phys., IIIe sér. t. XXIX, pag. 507 ff., 1850.

Darstellung wurden von Th. Hartig, [1] ferner von Kühne und Rudneff [2] in Vorschlag gebracht. Das Millon'sche Reagens wird bekanntlich durch Auflösung von Quecksilber in dem gleichen Gewichtstheile von concentrirter Salpetersäure und Verdünnen dieser Lösung mit dem gleichen Volum Wasser erhalten, und es ist derzeit sichergestellt, dass nicht die Anwesenheit von Quecksilberoxydul neben Oxyd, sondern die Anwesenheit der salpetrigen Säure zum Gelingen der Eiweissreaction erforderlich ist, welch' letztere in einer meist ziegelrothen Färbung sich zu erkennen gibt und erst in der Wärme vollständig gelingt.

Die Empfindlichkeit der Reaction wurde zuerst von Millon, dann von F. Hofmeister [3] festgestellt; nach ersterem lässt sich in der Lösung noch 0·00001, nach letzterem noch 0·00005 Albumin erkennen. Selbstverständlich ist die Empfindlichkeit bei Verwendung des Reagens unter dem Mikroskop als geringer anzusehen.

Schon Millon gab an, dass nicht nur die Eiweisskörper, sondern eine gute Zahl davon sich ableitender secundärer Producte die Reaction geben. Interessant ist Millon's Angabe, dass auch Stärke und Baumwolle durch das Reagens roth werden sollen. Für reine Producte gilt dies, wie ich mich überzeugt habe, nicht, und es ist gewiss nur ein Gehalt der Stärke an Kleber, oder sogenannte „unreife Baumwolle", die noch relativ reichlich Protoplasmareste enthält, welche Veranlassung zum Eintritt der Millon'schen Reaction geben können. Auch arabisches Gummi gibt nach Millon die Reaction. Dies kann ich bestätigen. Wie schon bei der Raspail'schen Reaction angeführt wurde, ist es jedenfalls das Gummiferment, welches die Veranlassung zum Zustandekommen der Millon'schen Reaction beim Gummi gibt.

Dass das Millon'sche Reagens auch Tyrosin und zwar in gleicher Weise wie Eiweiss anzeigt, ist schon von R. Hofmann [4]

---

[1] Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeimes etc. Leipzig, 1858, pag. 154.

[2] Zeitschr. f. analyt. Chem., 4. Bd., pag. 449.

[3] Siehe Hoppe-Seyler, Handb. d. phys. path. chem. Analyse, 1883, pag. 263.

[4] Liebig's Ann. d. Chemie und Pharm., 87. Bd., 1853, pag. 124.

angegeben worden, aber erst v. Vintschgau[1] zeigte den Zusammenhang dieser Reaction mit der Eiweissreaction. Ein tieferes Verständniss der Millon'schen Reaction wurde durch O. Nasse[2] herbeigeführt, welcher zeigte, dass es eine aromatische einfach hydroxylirte Atomgruppe im Eiweiss sei, welche durch das genannte Reagens angezeigt wird und dass die einfach hydroxylirten aromatischen Körper auch als solche die Reaction geben.

Ich kann die Angaben Nasse's nicht nur bestätigen, sondern auch durch die Auffindung neuer Thatsachen erweitern.

Von den von mir untersuchten Zersetzungsproducten der Eiweisskörper lieferten folgende die Millon'sche Reaction: Tyrosin, Hydroparacumarsäure und Phenol, also durchaus Verbindungen mit aromatischem Kern, an welchen eine Hydroxylgruppe direct geknüpft ist. Die übrigen aromatischen Zersetzungsproducte des Eiweiss (z. B. Phenylessigsäure, Phenylpropionsäure) geben die Reaction nicht.[3] Desgleichen nicht die Methanabkömmlinge der Eiweisszersetzungsproducte. (Ich untersuchte Essigsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Glycocoll, Asparagin und Asparaginsäure.)

Ich habe noch zahlreiche andere Körper in ihrem Verhalten zu Millon's Reagens geprüft. welche eine weitere Bestätigung der Angabe Nasse's liefern und zugleich eindringlich lehren, wie vorsichtig man bei der Deutung der Millon'schen Reaction sein müsse.

Mit Millon'schem Reagens nehmen Rothfärbung an:

A. Aromatische Oxysäuren: Oxybenzoësäuren wie Salicylsäure, ferner Oxymandelsäure, Oxyphenylessigsäure, Hydroparacumarsäure, Tyrosin.

B. Phenole: Phenol, Kresol, Thymol, Salicylaldehyd, Vanillin, Naphtol.

Dies sind aber durchwegs aromatische Körper mit einer direct an den aromatischen Kern geknüpften Hydroxylgruppe.

Die Millon'sche Reaction wurde hingegen nicht erhalten:

---

[1] Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss. Wien, m. n. Cl., LX. Bd., II. Abth., 1869, pag. 276.

[2] Über die arom. Gruppe im Eiweissmolecül. Ber. ü. d. Sitz. d. Naturf. Ges. zu Halle, im Jahre 1879. Sitz. v. 8. März.

[3] Das Indol gibt allerdings mit salpetrige Säure haltender Salpetersäure Rothfärbung.

A. Bei Körpern, in deren Molecül die *C*-Atome kettenförmig gebunden sind, auch wenn die OH-Gruppe direct an *C* geknüpft ist, z. B. den 6-werthigen Verbindungen Mannit, Dulcit etc., ferner überhaupt Alkoholen und diejenigen davon abgeleiteten Verbindungen, welche den geforderten Structurbedingungen entsprechen, Kohlenhydraten etc.

B. aromatischen Körpern, welche die OH-Gruppe gar nicht enthalten: z. B. Nitrobenzol, Indigotin, Phenylpropionsäure, Phenylessigsäure.

C. aromatischen Körpern, welche die OH-Gruppe nicht direct an den aromatischen Kern knüpfen, z. B. Mandelsäure.

D. Körpern mit mehrfach hydroxylirtem aromatischen Kern: z. B. Protocatechusäure, Gallussäure, Brenzkatechin, Resorcin, Orcin, Phloroglucin, Pyrogallussäure.

Die Nitrogruppe verhindert ebenfalls die Reaction: z. B. Pikrinsäure.

Die angeführten Thatsachen lehren uns also, dass nur die Körper mit einfach hydroxylirtem aromatischem Kern mit Millon's Reagens Rothfärbung annehmen. Daraus müssen wir schliessen, dass es auch im Eiweissmolecül ein einfach hydroxylirter Kern ist, welcher die Rothfärbung des Eiweiss mit Millon'schem Reagens bedingt, ein ähnlicher, wie er auch in dessen aromatischen Spaltungsproducten, Tyrosin,[1] Phenol etc. enthalten ist.

Wenn wir demnach unterm Mikroskop auf Einwirkung von Millon's Reagens auf das Präparat in diesem Rothfärbung beobachten, so können wir daraus nur auf das Vorhandensein eines organischen Körpers mit einfach hydroxylirtem aromatischen Kern schliessen. Gleichwohl werden wir später darlegen, dass das Millon'sche Reagens in Combination mit einem anderen für den Nachweiss von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut sich am meisten empfiehlt.

e) Die alkalische Kupfersulphatlösung als Specialreagens auf Eiweisskörper.

Die charakteristischen Färbungen, welche Eiweisskörper mit Kupfersulphat und Kali- oder Natronlauge annehmen, sind

[1] Die Constitution des Tyrosins wurde bekanntlich aufgeklärt in der Abhandlung: „L. Barth, Über die Constitution der Phloretinsäure und des Tyrosins." Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien. m. n. Cl., LX. Bd., II. Abth., pag. 11—16, 1869.

mehrmals entdeckt worden, zuerst wohl von Bence Jones,[1] dann von E. Humbert und G. v. Piotrowski.

E. Humbert[2] fand, dass Albumin, Fibrin, Caseïn und Leim sich in Flüssigkeiten durch die „zur Zuckerprobe dienende alkalische Kupfersulphatlösung" nachweisen lassen. Es entsteht eine schön violette Färbung, die Reaction tritt nur bei einem grösseren Gehalt an Albumin schon in der Kälte ein, andernfalls erst beim Erhitzen. Fibrin erzeugt eine mehr weinrothe, Leim eine Färbung mit blauer Nuance.

G. v. Piotrowski[3] bezeichnet den Farbenton seiner „neuen Reaction auf Eiweisskörper und deren nähere Abkömmlinge" als „schön tief veilchenblau." Er versuchte die Reaction auch mit der festen Substanz durch Betupfen derselben mit den Reagentien und fand, dass die Reaction auch bei mikroskopischen Untersuchungen brauchbar sei. Auch er fand gleich Humbert, dass durch Zusatz einer Säure die Färbung verschwinde, durch fixe Alkalien jedoch, wiewohl nicht immer mit der früheren Intensität wiederhergestellt werden könne. Von Körpern, welche sich gegen das Reagens indifferent verhalten, werden angeführt: Hämatin, Kohlehydrate. Fette, Glycerin (d. h. es bildete sich der gewöhnliche Niederschlag von Kupferoxydhydrat).

Nach Ritthausen[4] ist der durch die Kupferprobe hervorgebrachte Farbenton der Lösung bei:

Caseïn und Fibrin aus Weizen und Roggen: blauviolett.

Legumin aus Hafer: tiefblauviolett.

Legumin aus Erbsen: rothviolett, violett, blauviolett, je nach der Menge des vorhandenen Kupferoxydes.

Gliadin aus Weizen: tiefviolett, Gliadin aus Hafer: violett (wenig intensiv).

Ich kann den bereits erwähnten Fällen aus eigener Erfahrung noch hinzufügen, dass bei Albumin (aus *Zea mais*) und

---

[1] Ann. d. Chemie u. Pharm., LXVII. Bd., pag. 102.

[2] Journal de Pharmacie et de Chimie par Boullay etc. Paris, III. sér., XXVIII. Bd., pag. 272.

[3] Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl., XXIV. Bd. 1857, pag. 335 ff.

[4] Zeitschr. f. analyt. Chem., VII. Bd., pag. 266, ferner Ritthausen, „Die Eiweisskörner", vgl. auch Sachsse, „Chemie u. Physiologie der Farbstoffe etc.", §. 59.

Vitellin (aus *Cucurbita Pepo*) die Färbung intensiv violett, bei Fibrin (aus *Zea mais*) schwach violett, bei Legumin (aus *Vicia Faba*) azurviolett ist.

Nach v. Brücke[1] werden die Peptone durch das Kupferreagens purpurroth, die Eiweisskörper violett. So dürften sich durch Anwesenheit von Peptonen neben Albuminaten die Farbennuancen erklären, welche die natürlich vorkommenden Eiweisskörper darbieten.

Die Eiweisskörper gehen mit dem Kupfersalz eine Verbindung ein, die, aus alkalischer Lösung gefällt, in überschüssigem Alkali sich farbig löst. Auch die Kohlehydrate (namentlich Zucker oder dextrinartige Substanzen) und gewisse Säuren geben in alkalischer Lösung lösliche Kupferoxydverbindungen. Treten diese neben den Eiweisskörpern gleichzeitig auf, so erscheint die Flüssigkeit in dem Masse tiefer blau, als von derartigen Körpern vorhanden ist.

In die Mikrochemie wurden Kupfersulphat und Kalilauge 1859 von Julius Sachs[2] eingeführt. Unter anderem fand er auch, dass Eiweiss durch Mengung mit Dextrin, Rohrzucker, Traubenzucker niemals ganz unkenntlich gemacht wird, wenn man die Quantitäten des in die Zelle eintretenden Kupfersulphates reguliren kann. Die Eiweisskörper zeigen nach demselben Autor alle ein und dieselbe Violettfärbung,[3] was mit den oben mitgetheilten Beobachtungen Ritthausen's und Brücke's nicht übereinstimmt.

Behufs mikrochemischen Nachweises der Eiweisskörper pflegt man die Schnitte gewöhnlich zuerst mit Kupfersulphat, dann mit Kalilauge zu behandeln. Auf Grund dieses Verfahrens gelangten Sachs[4] und W. Hofmeister[5] zu der Ansicht, dass das Protoplasma völlig ausgebildeter Zellen wohl stickstoff-, aber nicht eiweisshältig zu sein scheine, da sie daselbst keine Reaction erhielten.

---

[1] Physiologie, 4. Aufl., pag. 88 ff.

[2] „Über einige neue mikroskop. chem. Reactionsmethoden.“ Sitzb. d. Akad., Wien, m. n. Cl., XXXVI. Bd.

[3] Sachs untersuchte Hühnereiweiss, Kaseïn, Legumin und Kleber, ferner Schnitte von *Vicia Faba*, *Phaseolus multiflorus*, Kürbis, Mais.

[4] „Mikrochem. Untersuchungen“. Flora 1862.

[5] Pflanzenzelle, pag. 2.

Loew und Bokorny[1] fanden jedoch, dass dieselben Reagentien, in umgekehrter Reihenfolge (KOH v. sp. Gew. 1,33 ca. 5 Minuten, dann 1/2 proc. Kupfersulphatlösung) angewandt, das Eiweiss auch im Protoplasma der völlig ausgebildeten Zellen anzeigen.

Nach den bereits citirten Untersuchungen F. Hofmeister's erscheint die Kupferprobe im Vergleich zu den übrigen Eiweissreactionen als die am wenigsten empfindliche.

f) Die molybdänsäurehaltige Schwefelsäure.

Von Dr. A. Fröhde[2] wurde im Jahre 1868 die folgende Notiz über eine neue Reaction der Eiweisskörper veröffentlicht: „Behandelt man die Eiweisskörper im festen Zustande mit molybdänsäurehaltiger Schwefelsäure, so werden sie intensiv blau gefärbt. Unter anderem zeigen die Schnitte von Samenkörnern, besonders Getreidearten, sowie die Muskelfasern diese Reaction deutlich. Gewisse Reagentien verhindern die blaue Farbenerscheinung."

Um mir ein Urtheil über die mikrochemische Anwendbarkeit der Methode zu bilden, prüfte ich das Verhalten der molybdänsäurehaltigen Schwefelsäure (bereitet durch Auflösen von molybdänsaurem Ammon in conc. Schwefelsäure) gegen verschiedene Körper.

Von Eiweisskörpern pflanzlichen Ursprunges prüfte ich Vitellin, Albumin, Fibrin, Legumin, sowohl in fester Form als in Lösung. In beiden Fällen erhielt ich intensive Blaufärbung. Die Prüfung anderweitiger Substanzen ergab folgendes Resultat:

Glycerin: beim Schütteln intensiv blau.

Xanthin (fest und in Lösung): keine Färbung.

Tyrosin, Mannit, Gummi, Rohrzucker, Phenol, alle sowohl in fester als in flüssiger Form: intensiv blau. Desgleichen reine Stärke, Stärkekleister, Invertzucker, Granulose.

Phloroglucin: in fester Form intensiv blau; in wässeriger Lösung durch grün in blau.

---

[1] „Die chem. Kraftquelle im lebenden Protoplasma", 1882, pag. 58, ferner Oscar Löw in Botan. Zeitg., 1884, Sp. 273.

[2] Ann. d. Chem. u. Pharm., von Wöhler, Liebig & Kopp, XLV., 1868, pag. 376.

Thymol: in fester Form blau, in alkoholischer Lösung durch violett in blau.

α-Naphtol: in fester Form grün, in alkoholischer Lösung durch violett in blau.

Vanillin: in fester Form intensiv dunkelblaugrün.

Coniferin: in fester Form intensiv dunkelblau.

Baumwolle: intensiv dunkelblau.

Es nehmen also sehr verschiedenartige Körper mit der molybdensäurehaltigen Schwefelsäure intensive Blaufärbung an.

Behufs Erklärung der Blaufärbung muss ich auf ein bekanntes Verhalten der Molybdaensäure (MoO_4H_2) reducirenden Mitteln gegenüber zurückkommen. Fügt man nämlich zu der conc. Lösung eines molybdänsauren Salzes Salzsäure, so scheidet sich Molybdänsäure als weisser krystallinischer Niederschlag aus, der sich in überschüssiger Salzsäure leicht löst. Fügt man zu dieser Lösung Zink, so färbt sie sich in Folge der Bildung niederer Oxyde erst blau, dann grün (Bildung von Sesquioxyd) und zuletzt braunroth und gelb, wobei ein Suboxyd ($Mo_5O_7 = 2Mo_2O_3MoO$) entsteht. Durch Kaliumpermanganat werden diese niederen Oxydationsstufen wieder zu Molybdänsäure (MoO_4H_2) oxydirt [1]. — Wendet man molybdänsäurehaltige Schwefelsäure an, so muss die Reduction der Molybdänsäure bis zu einem gewissen Grade gehemmt werden, da die Schwefelsäure oxydirend wirkt. Die Hemmung der Reduction wird abhängig sein einerseits von der Reductionskraft der Substanz und anderseits von der zur Geltung gelangenden Oxydationskraft der Schwefelsäure.

Glycosen, Aldehyde sind durch ein hohes Reductionsvermögen ausgezeichnet. Da durch Kaliumpermanganat auch bei den übrigen (untersuchten) Körpern, welche mit molybdensäurehaltiger Schwefelsäure intensive Blaufärbung annehmen, die Bildung dieses blauen Körpers verhindert wird, so scheint es auch in diesen Fällen nicht unbegründet, den blauen Körper als ein niederes Oxyd der Molybdänsäure zu betrachten, entstanden durch die Reductionswirkung des betreffenden untersuchten Körpers. Eine weitere Stütze für diese Ansicht ist der folgende mikroskopische Befund. Beobachtet man nämlich unter Mikroskop

[1] Vgl. Richter, Anorgan. Chemie, IV. Aufl., 1884, pag. 469.

die Einwirkung der molybdänsäurehaltigen Schwefelsäure, z. B. auf festes Eiweiss, so sieht man, wie die Flüssigkeit (die Säure) sich blau färbt. Dieselbe Beobachtung kann man bei Stärke, Zucker, Gummi etc. in fester Form machen. Schliesslich speichert der feste Körper die blaue Verbindung (wahrscheinlich Mo_3O_8) auf, die Flüssigkeit wird farblos.

Der Umstand, dass im Pflanzenreiche allgemein verbreitete Körper aus verschiedenen chemischen Gruppen die intensiv blaue Farbenreaction geben und ferner der Umstand, dass die blaue Verbindung (Mo_3O_8) sich in der Flüssigkeit bildet, aus welcher sie erst aufgespeichert wird, lässt nur eine sehr beschränkte Verwerthung der Fröhde'schen „Eiweissreaction" bei mikrochemischen Untersuchungen zu; als Specialreaction kann sie keinesfalls gelten.

g) Ein neues Reagens.

Das Alloxan und einige verwandte Carbamide haben die Eigenschaft, die Haut roth zu färben. Ich ging dieser Reaction nach und fand, dass man Alloxan in der That — unter gewissen Bedingungen — als mikrochemisches Reagens auf Eiweisskörper und gewisse Spaltungsproducte derselben verwenden kann.

Das Alloxan (=Mesoxalylharnstoff) bildet Krystalle, welche ebenso leicht in Wasser wie in Alkohol löslich sind. Aus einer heissen Lösung scheiden sich kleine beständige Krystalle mit 1 H_2O ab. Die grossen Krystalle, die man aus einer warmen Lösung erhält, verwittern an der Luft. Alloxanlösungen färben die Haut nach einiger Zeit purpurroth und geben ihr einen unangenehmen Geruch.

Ein Versuch mit festen Eiweisskörpern zeigt, dass selbe in einigen Minuten dieselbe purpurrothe Färbung annehmen. Aber nicht bloss Eiweisskörper geben die Reaction, sondern auch Tyrosin, Asparaginsäure (sehr intensiv), Asparagin[1], vermuthlich überhaupt jene organischen Körper — vielleicht nur unter gewissen Bedingungen — welche die Gruppe $CH_2.CH(NH_2).CO_2H$ im Molecül enthalten. Vergleicht man nämlich die Structurformeln

[1] Diese Angabe bezieht sich nicht auf Lösungen.

der drei Körper Tyrosin: $C_6H_4\left<\begin{matrix}OH \\ CH_2.CH(NH_2).CO_2H\end{matrix}\right.$

Asparaginsäure: $\begin{matrix}CH(NH_2).CO_2H \\ | \\ CH_2.CO_2H\end{matrix}$ und Asparagin:

$$\begin{matrix}CH(NH_2).CO_2H \\ | \\ CH_2.CO.NH_2\end{matrix}$$

mit einander, so findet man, dass im Molecül eines jeden dieser Körper nur die Atomgruppe $CH_2.CH(NH_2).CO_2H$ gemeinsam sich vorfindet. Ich habe eine grosse Anzahl von organischen Körpern aus den verschiedenen Gruppen mit Alloxan auf Rothfärbung geprüft, jedoch eine solche nicht erhalten.

In Lösungen von Eiweiss und den übrigen in Betracht kommenden Körpern erhält man die purpurrothe Färbung mit Alloxan schwieriger, als bei denselben Körpern in fester Form.

Bei der Deutung einer mit Alloxan erhaltenen Rothfärbung muss der Umstand in Betracht gezogen werden, dass festes Alloxan, wie es nach dem Verdunsten der Lösung an der Luft zurückbleibt, binnen mehreren Stunden — allerdings schwache — Rothfärbung annimmt, besonders bei Anwesenheit von Ammoniak. Diese Rothfärbung schlägt durch Natronlauge in Blauviolett um. Erhitzt man Alloxanlösung mit Ammoniak, so bildet sich ebenfalls der rothe Körper (wahrscheinlich Murexid oder eine ähnliche Verbindung); durch Natronlauge wird die Rothfärbung in Blauviolett umgewandelt.

Um also Eiweiss und die übrigen Körper mit Alloxan nachzuweisen, ist es nothwendig, in der Kälte zu operiren und Ammoniak möglichst auszuschliessen. In der Natronlauge hat man ein Mittel, die Reaction der Gruppe $CH_2.CH(NH_2).CO_2H$ zu sichern, da sie die durch diese Gruppe verursachte Rothfärbung unverändert lässt.

Ich reagirte mit concentrirter wässeriger oder alkoholischer Alloxanlösung und bediente mich auch einer concentrirten Ätznatronlösung.

Freie Säuren verhindern die rothen Farbenreactionen des Alloxans.

Von der mikrochemischen Anwendbarkeit der Farbenreaction mit Alloxan behufs Nachweises der Eiweisskörper kann man

sich leicht an durch das Endosperm von Samen geführten Schnitten, welche Aleuron und Eiweisskrystalle enthalten, überzeugen. Um die übrigen, ebenfalls mit Alloxan reagirenden Körper auszuschliessen, muss man die betreffenden Präparate mit heissem Wasser auslaugen oder mit Wasser auskochen. Pilzhyphen reagiren im allgemeinen ganz hübsch.

Bei der Ausführung der Alloxanreaction ist es gut, mit möglichst wenig Flüssigkeit zu arbeiten. Im Übrigen ist es unbedingt erforderlich, die angedeuteten Vorsichten nicht ausser Acht zu lassen.

ANHANG.

Die von Adamkiewicz [1] entdeckte Reaction der Eiweisskörper und Peptone mit Eisessig und conc. Schwefelsäure (Violettfärbung) lässt sich mikrochemisch schon wegen zu geringer Intensität der Färbung nicht anwenden.

Die Aldehydreaction mit fuchsinschwefeliger Säure kann zur Erkennung von Eiweisskörpern unter dem Mikroskop nicht herangezogen werden, wie bereits Löw und Bokorny [2] nachgewiesen haben; denn lässt man einen Tropfen der fuchsinschwefeligen Säure nur kurze Zeit in Contact mit Luft, so sieht man mit der Verdunstung der vorhandenen schwefeligen Säure eine Rothfärbung eintreten. Bei Luftabschluss zeigt das Präparat selbst nach 24^h keinerlei Rothfärbung.

In neuerer Zeit wurde von E. Zaccharias [3] die schon von Hartig angegebene Berlinerblaureaction modificirt und neuerlich in die Mikroskopie eingeführt. Auf Grund derselben Reaction gelangte E. Zaccharias zu dem Schlusse, dass im Protoplasma völlig ausgebildeter Zellen, da keine Blaufärbung zu erzielen war, Plastin vorherrsche. Oscar Löw [4] erhielt jedoch die Blaufärbung nach vorausgegangener Quellung der Präparate in Kali-

---

[1] Literatur bei Hoppe-Seyler, Handb. d. phys. path. chem. Anal., 1883, pag. 262.

[2] Botan. Zeitg. 1882, Sp. 832.

[3] Botan. Zeitg. 1883, Sp. 211.

[4] Botan. Zeitg. 1884, Sp. 273, „Über den mikrochem. Nachweis von Eiweissstoffen".

lauge. Da bei dieser Reaction nur das innerhalb der Zelle aus den zugeführten Reagentien gebildete Berlinerblau von den Eiweisskörpern aufgespeichert wird, also eine chemische Action seitens der Eiweisskörper nicht statt hat, so fällt dieselbe nicht in den Rahmen dieser Arbeit.

Versuche, den Stickstoff des in der Zelle enthaltenen Eiweiss mittelst der bekannten Natriumprobe derart zur Reaction zu bringen, dass man dann aus in den Zellen eingetretener Blaufärbung die Vertheilung der Eiweisskörper unter dem Mikroskop studiren könnte, scheiterten, da ich eine passende Modification der Methode nicht fand.

Die Anwendung der Jodreaction der Eiweisskörper wurde perhorrescirt, da, wie schon von verschiedenen Seiten hervorgehoben wurde, nicht allein alle stickstoffhaltigen Körper, sondern auch andere gelbe bis braune Färbung damit annehmen.

Allerdings pflegt man sich auch heutzutage häufig mit der Gelbfärbung durch Jod und dem Vermögen Farbstoffe (Carmin, Gentianaviolett, Anilinblau, Hoffmannsblau) aufzuspeichern zu begnügen, um auf die Eiweiss-, resp. Plasmanatur eines Gebildes zu schliessen. Es ist dies namentlich bei den Studien über die protoplasmatischen Verbindungsfäden der Fall gewesen. Allein dieses Vergehen konnte für die vorliegende Untersuchung nicht massgebend sein.

Im Vorangegangenen habe ich den Werth der einzelnen Farbenreactionen auf Eiweiss beleuchtet. Wir haben allerdings gesehen, dass eine mikrochemisch verwerthbare Farbenreaction, die nur auf Eiweisskörper deutet bisher nicht aufgefunden wurde. Allein die mannigfaltigen Qualitäten jener Atomcomplexe, welche das Eiweissmolekül bilden, geben der Hoffnung Raum, durch eine Combination passender Reactionen auf das Eiweiss schliessen zu können.

Es handelt sich nun darum, die verschiedenen Eiweissreactionen mit Rücksicht auf den Nachweis der Anwesenheit des Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut gegeneinander abzuwägen.

Dass die Färbung der Eiweisskörper mit concentrirter Salzsäure zum mikrochemischen Nachweis wegen allzu geringer Intensität überhaupt nicht angewendet werden kann, habe ich schon früher betont.

Die Untersuchungen F. Hofmeister's haben gelehrt, dass man erkennen kann einen Gewichtstheil Albuminstoff
mittelst concentrirter Salpetersäure in 20.000 Theilen Lösung
„ Kupferreaction in . . . . . 2.000 „ „
„ Millon's Reagens . . . . . 20.000 „ „

Diese Zahlen kann ich im Allgemeinen bestätigen; man darf sie jedoch nicht, wie ich oben auseinandersetze, auf alle Eiweisskörper übertragen. Auch ist zu beachten, dass die angegebene Empfindlichkeit der Reactionen bei deren mikrochemischen Anwendung sowohl durch die vergrössernde Wirkung des Mikroskops, als durch die complicirten chemischen und physikalischen Verhältnisse im Präparat bedeutend herabgedrückt wird. Jedoch wird die Millon'sche Reaction der Xantoproteïnsäurereaction unter gleichen Bedingungen wohl stets überlegen sein. Auch die Raspail'sche Reaction ist im Allgemeinen sehr empfindlich.

Wie bereits oben bemerkt, geben *(Mais)*- Fibrin und Rhodospermin die Xanthoproteïnsäurereaction nur sehr schwach, Rhodospermin die Raspail'sche Reaction überhaupt nicht; octaëdrisches Rhodospermin wird mit Millon'schem Reagens nur bräunlichgelb.

Der Farbenton ist bei den verschiedenen Eiweisskörpern nicht gleich. Zur Erläuterung diene die folgende Tabelle:

	Albumin *(Zea Mais)*	Fibrin *(Zea Mais)*	Legumin *(Vicia Faba)*	Vitellin *(Cucurbita Pepo)*
Raspail'sche Reaction	rosenroth	intensiv. roth als Alb.	rosenroth in violett	lila
Kupfer - Reaction	intens. violett	schw. violett	azurviolett	violett
Xanthoproteïnsäure - Reaction	gelb	schw. violett	gelb	gelb
Millon'sche Reaction	fleischroth	carminroth	fleischroth in braunroth	ziegelroth

Diese Angaben gelten für gleiche Volumina des festen Eiweisskörpers mit dem betreffenden Reagens auf gleiche Weise behandelt.

Die Gelbfärbung durch Salpetersäure, die Rothfärbung mit Zucker und Schwefelsäure, die Violett- (respective weinrothe) Färbung mit Kupferoxydsalz und Alkalilauge, die Blaufärbung mit dem Fröhde'schen Reagens, sie alle diese Färbungen zeigen uns organische Körper aus den verschiedensten natürlichen Gruppen.

Ich habe bereits bei der Besprechung der einzelnen Reactionen hervorgehoben, dass wir aus dem Auftreten der Färbung nur einen sehr allgemeinen Schluss ziehen können.

Unter allen Eiweissreactionen zeigt uns nur die Millon'sche Reaction eine bestimmte Structur an. Das Eintreten einer Rothfärbung, durch dieses Reagens hervorgerufen, verweist uns auf jene organischen Körper, die einen einfach hydroxylirten aromatischen Kern besitzen. Dadurch bewegt sich die weitere Entscheidung in einem chemisch begrenzten Gebiet. Das ist der eine nicht zu unterschätzende Vortheil des Millon'schen Reagens, ein anderer ist der, dass es die Reaction fixirt, das heisst dort anzeigt, wo sie auftritt.

Aber auch das Millon'sche Reagens hat seine Fehler. Auch diese Reaction kann durch gewisse Körper — wie wohl die meisten Reactionen — verhindert werden. Wirkt das Reagens auf sehr wasserreiche Gewebe ein, so kann es z. B. durch Bildung basischer Quecksilbersalze wirkungslos werden. Das Reagens wirkt desto besser, je frischer es ist. Man benütze es nur so lange als damit z. B. die Krystalloïde im Endosperm von Ricinussamen schön ziegelroth gefärbt werden. Bei Bereitung des Reagens empfiehlt es sich nach der von Hartig empfohlenen Methode vorzugehen und genau zu wägen.

Auf diese Art bereitet, erhält das Reagens die richtige Menge an freier salpetriger Säure. Ein längere Zeit aufbewahrtes Reagens kann man durch Hinzufügung einiger Tropfen einer etwa 0·1% Kaliumnitritlösung wirkungsfähiger machen.

Von in der Zellhaut vorkommenden Körpern mit einfach hydroxylirtem aromatischen Kern kannte man bis jetzt nur das Vanillin. Beim Nachweis von Eiweiss hat man demnach vor

Allem das Vanillin auszuschliessen. In der von Wiesner entdeckten Holzsubstanz-(Vanillin) Reaction mit Phloroglucin und Salzsäure haben wir ein ausgezeichnetes Mittel, um das Vorhandensein desselben nachzuweisen. Wir könnten also mit Millon'schem Reagens erhaltene Rothfärbung, wenigstens in jenen Zellhäuten, welche die Vanillinreaction nicht geben, auf vorhandenes Eiweiss deuten. Noch sicherer geht man, wenn man die Schnitte mit heissem Wasser auslaugt. Dadurch coagulirt das in der Zellhaut vorhandene Eiweiss, während etwa vorhandenes Tyrosin oder Phenol in Lösung gehen. Den ausgelaugten oder ausgekochten Schnitt befreit man, ehe man ihn mit Millon'schem Reagens behandelt, mittelst Filterpapier von der anhaftenden Flüssigkeit.

Durch die von mir angegebene Alloxanlösung wird die Gruppe $—CH_2.CH(NH_2).CO_2H$ angezeigt. Es kommen dabei hauptsächlich Eiweiss, Tyrosin, Leucin, Asparagin, Asparaginsäure in Betracht. Bezüglich der Methode verweise ich auf Seite 136 dieser Arbeit.

Es scheint mir nicht unwichtig, das Verhalten der beiden in den vegetabilischen Zellen so sehr verbreiteten Körper Vanillin und Coniferin gegen die Eiweissreagentien hier anzuführen:

Vanillin.

Milon's R.: Intensiv roth, Stich in roth-violett.

Raspail's R.: Intensiv rothviolett.

H_2SO_4, allein: rothbraun.

$CuSO_4 + KOH$[1]): rother Niederschlag.

HNO_3 (rauchend): Rubinroth, mit NH_3 gelbe Nebel, die Flüssigkeit bleibt rubinroth.

HCl: zeisiggrün.

Fröhde's R.: intensiv dunkelblaugrün.

Alloxan: keine Reaction.

Coniferin.

M.: gelbe Färbung.

R.: Intensiv rothviolett.

H_2SO_4 allein: Intensiv violett.

$CuSO_4 + KOH$[1]): rother Niederschlag.

HNO_3 (rauchend): braungelb, mit NH_3 dichte weisse Nebel Färbung der Flüssigkeit unverändert.

HCl: graublau.

Fr.: intensiv dunkelblau.

A.: keine Reaction.

---

[1]) Nach Art der Trommer'schen Probe ausgeführt.

Daraus ist auch ersichtlich, dass das Alloxan namentlich zum Eiweissnachweis in der verholzten Zellwand herangezogen werden kann.

Im Wesentlichen besteht meine Methode, das Eiweiss mikroskopisch nachzuweisen, in Folgendem:

1. Im Nachweis der einfach hydroxylirten aromatischen Gruppe durch das Millon'sche Reagens, nach Ausschluss freier oder anderweitig gebundener einfach hydroxylirter aromatischer Substanz.

2. Im Nachweis jener Atomgruppe, welche bei Zersetzung der Eiweisskörper als Asparaginsäure oder Asparagin austritt, durch Alloxan, nach Beseitigung der letztgenannten Substanzen und anderer nicht eiweissartiger Verbindungen. (Tyrosin etc.) Um nun zu entscheiden, ob das auf diese Weise nachgewiesene Eiweiss als Protoplasma der Zellhaut angehört, und um den Einwand, man habe es mit „infiltrirtem" Eiweiss zu thun — wogegen indess schon die Entwicklungsgeschichte der Zellhaut spricht — auszuschliessen, wurden Versuche mit der bekannten alkalischen Silberlösung, welche nach Loew und Bokorny nur durch das lebende Protoplasma reducirt wird, angestellt.

II.

Die ersten Versuche in den Zellmembranen der Pflanzen Eiweiss nachzuweisen rühren von Mulder[1] her. Er bediente sich hiezu der Xanthoproteïnsäure- und der Salzsäurereaction. Nach den oben mitgetheilten Darlegungen ist die von Mulder angewandte Methode zu unvollständig gewesen, als dass er hätte zu sicheren Resultaten gelangen können. Auch hat schon Böhm[2] gezeigt, dass die von Mulder durch Salzsäure erhaltenen Membranfärbungen nicht auf Eiweiss zurückzuführen sind, sondern durch besondere in der Zelle auftretende Chromogene

---

[1] Versuch einer allgemeinen Physiologie, von G. J. Mulder. Besorgt von Dr. H. Kolbe. Braunschweig 1844—1851, vgl. bes. pp. 441—508.

[2] „Beiträge zur näheren Kenntniss der Genesis und Function von Pflanzenfarbstoffen". Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl.; XLV. Bd., II. Abth., Jahrg. 1862.

hervorgerufen werden. Es ist dann später von v. Höhnel[1] dargelegt worden, dass das in der Zelle vorhandene Chromogen (Höhnel nennt es Xylophilin) nur bei Gegenwart der Holzsubstanz durch Salzsäure die von Mulder beobachtete charakteristische Färbung hervorruft.

Aber erst durch Wiesner's[2] Identificirung des fraglichen Chromogens (Höhnel's Xylophilin) mit dem Phloroglucin (beziehungsweise Brenzcatechin und verwandten Körpern) und durch die unter Wiesner's Leitung von M. Singer[3] ausgeführte Identificirung der in der verholzten Zellwand vorkommenden bei der genannten Reaction wirkenden Substanz mit dem Vanillin wurde die Mulder'sche Salzsäurereaction vollständig erklärt.

Für einzelne jener Fälle, wo Mulder mit Salpetersäure und Ammoniak Gelbfärbung beobachtete, kann ich auf Grund meiner Untersuchungsmethode das Vorkommen von Eiweiss in der Membran bestätigen, namentlich für die Holz- und Bastfaserzellen von *Sambucus nigra* (frische einjährige Zweige), für das Korkgewebe von *Sambucus* und *Tilia parvifolia*, ferner für die Cuticula von *Aloë*, *Agave*, *Phormium tenax*, *Hoja carnosa* und *Sambucus*.

Dass in Innenhäuten Eiweiss vorkomme, wurde schon 1864 von Wiesner[4] im hohen Grade wahrscheinlich gemacht.

Dippel[5] und Solla[6] fanden im Gegensatz zu Schacht, dass die jungen Zellen der Phanerogamen die Zellstoffreaction nicht zeigen. In einer auf Anregung des Herrn Professor

---

[1] „Histochem. Beiträge", ibid., LXXVI. Bd., I. Abth., Jahrg. 1877.

[2] „Das Verhalten des Phloroglucins und einig. verw. Körper auf verholzte Zellmembranen, LXXVII. Bd., 1878.

[3] „Beitr. zur näheren Kenntniss der Holzsubstanz u. d. verholzten Gewebe", ibid., LXXXV. Bd., 1882.

[4] „Über die Zerstörung der Hölzer a. d. Athmosphäre". Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl., 1864, XLIX. Bd., p. 32 (Sep. A.), siehe auch „Organisation der pflanzlichen Zellhaut", ibid. XCIII. Bd., Jahrg. 1886, p. 38 (Sep. A.).

[5] Dippel, das Mikroskop II, pp. 7, 8, 49, 230.

[6] Österr. Botan. Zeitg. 1879, p. 351.

Wiesner unternommenen Arbeit K. Richter's[1] wurde es höchst wahrscheinlich gemacht, dass die Pilzzellhäute ihres Eiweissgehaltes wegen der Cellulosereaction so schwer zugänglich sind. Wiesner[2] selbst konnte in Vegetationsspitzen, Cambium und Phellogen das Eiweiss in den Membranen indirect (Eintreten der Cellulosereaction nach Peptonisirung) und direct (Farbenreaction) nachweisen, und erbringt durch Discussion einer an *Polyporus fomentarius* ausgeführten Stickstoffbestimmung den Beweis, dass es Zellen gibt, in welchen die Hauptmasse des Protoplasma der Membran angehört.[3]

In der im Wiener pflanzenphysiologischen Institut ausgeführten Arbeit „Beiträge für Mikrochemie der Flechten" führt Dr. K. B. J. Forssell[4] auch einzelne Fälle (Hyphen einiger Flechten und Zellen einiger Algen) an, in welchen sich mit Hilfe der Raspail'schen oder der Millon'schen Reaction, oder beider Eiweiss nachweisen liess. Diese Ergebnisse kann ich auf Grund der bei den vorliegenden Untersuchungen angewandten Methode bestätigen.

Bevor ich jedoch daran gehe, die von mir beobachteten Fälle des Vorkommens von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut mitzutheilen, muss ich noch auf die bereits an anderer Stelle citirte Abhandlung von Julius Sachs „Über einige neue mikroskopisch-chemische Reactionsmethoden" (1859) zurückkommen. Sachs[5] erhielt mit Kupfersulphat und Kalilauge in Zellenmembranen nur Blau- oder Gelbfärbung. Die Blaufärbung deutet auf Cellulose und „tritt häufig schon dann auf," wenn die Vitriollösung nur einige Minuten eingewirkt hatte." „In diesem Falle erhält man dann die Zellstoffreaction zugleich mit den Reactionen auf Eiweiss und lösliche Kohlehydrate". Die Blaufärbung trat in Membranen jugendlicher Zellen ein und scheint gegen deren Eiweissgehalt zu sprechen. Erinnert man sich aber daran, wie

[1] „Beitr. z. gen. Kenntniss der chem. Besch. d. Zellmembr. d. Pilze." Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl., LXXXIII Bd., I. Abth., Jahrg. 1881, Maiheft, p. 13 (Sep. A.).

[2] „Organisation d. vegetab. Zellhaut", p. 42 (Sep. A.).

[3] Wiesner, ibid., p. 45 (Sep. A.).

[4] Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss., Wien, m. n. Cl., XCIII. Bd., I. Abth., Jahrg. 1886., Aprilheft, p. 11 f.

[5] l. c. pp. 18, 19.

schwer die Cellulose in jugendlichen Zellmembranen durch Jodpräparate, Kupferoxydammoniak nachzuweisen ist, ferner daran, dass die Reaction mit Kupfersulphat und Kalilauge die am relativ mindesten empfindliche Farbenreaction der Eiweisskörper ist — hatte sie ja doch zum Satze vom eiweisslosen Protoplasma geführt — so werden wir dem Umstande, dass in Zellwänden die Kupferreaction auf Eiweiss nicht eintritt, keine sonderliche Bedeutung beimessen können.

Aus demselben Grunde musste auf eine Combination dieser Reaction mit der Millon'schen Probe verzichtet werden, obwohl gerade diese Combination, wie von Brücke[1] hervorhebt, von grossem praktischen Werthe ist, da sie die Eiweisskörper von anderen Substanzen unterscheidet, welche die Millon'sche Probe auch geben. Im Folgenden gebe ich eine Zusammenstellung der von mir beobachteten Fälle des Vorkommens von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut. Die Methode, der ich mich bediente, habe ich schon früher (Seite 142) auseinandergesetzt und zu begründen versucht.

In der Regel bediente ich mich des Millon'schen Reagens, nachdem ich mich durch anderweitige Reactionen davon überzeugte, dass die eben schon eingehend erörterten, die Reaction störenden Körper (Vanillin, Tyrosin u. s. w.) nicht vorhanden sind, oder wenn sie vorhanden waren, nachdem ich dieselben durch Auskochen der Schnitte mit Wasser beseitigt hatte.

Wo ich anderweitig prüfte, ist dies besonders angegeben, desgleichen sind jene Fälle besonders namhaft gemacht, in denen ich mit aller Vorsicht und unter Zuziehung der Alloxanreaction reagirte.

Bezüglich der Anwendung des Millon'schen Reagens möchte ich noch Folgendes bemerken:

Das Millon'sche Reagens färbt Eiweisskörper bekanntlich roth. Der rothe Farbenton schwankt — je nach den Umständen — zwischen rosenroth, ziegelroth, purpurn und rothbraun. Die Zellhäute färben sich zumeist mehr oder minder rosenroth. Bei Zellhautuntersuchungen empfiehlt es sich, das Millon'sche Reagens in der Kälte einwirken zu lassen. Die Reaction tritt gewöhnlich bald ein und bleibt fixirt.

[1] Physiologie I. Th., IV. Aufl., p. 88.

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf frisches Material. Experimentirt wurde fast ausschliesslich — wo Schnitte nothwendig waren — mit Querschnitten durch die betreffenden Pflanzentheile.

A). Gewebe der Kryptogamen.

Pilze: Hyphen von *Polyporus sulphureus* Bull., *P. fomentarius* ergaben bei der Prüfung mit Millon'schem Reagens ein zweifelhaftes Resultat, besser gelingt die Xanthoproteïnsäurereaction; hingegen reagirten sie sehr hübsch mit Alloxan.

Flechtenhyphen: * *Cladonia gracilis* L., * *Lobaria pulmonaria* Hoffm.

* *Peltigera canina* L. gaben Millon'sche und Alloxanreaction.

Algen: In den Membranen der vegetativen Zellen von *Chara*, *Chondrus crispus* Lyngb., *Cladophora bombycina* Agard und andere Species, * *Ecklonia baccata*, * *Eucheuma spinosum* Ag., * *Gelidium cartilagineum* Grev., *Oedogonium* sp. besonders deutlich der sog. „Cellulosering", *Vaucheria* sp.

Hingegen konnte in folgenden Algen das Eiweiss in der Membran nicht nachgewiesen werden: *Chaetophora endiviaefolia*, *Spirogyra* sp., *Zygnema cruciatum*.

Moose: *Polytrichum commune* Membranen der Blattzellen.

Gefässkryptogamen: *Alsophila australis* Wedelstiel: Epidermis, Siebtheil der Gefässbündel; *Equisetum maximum*, *palustre* Stamm: Siebtheil der Gefässbündel; *Scolopendrium officinarum* Wedelstiel: Epidermis, Siebtheil der Gefässbündel; *Selaginella Willdenowiana* Stamm: Epidermis, Siebtheil der Gefässbündel.

B) Gewebe der Phanerogamen.

I. Meristeme.

Vegetationsspitze des Stammes: *Elodea canadensis*, *Hippuris vulgaris*, *Myriophyllum verticillatum*, *Phaseolus multiflorus*, *Zea mais*.

Vegetationsspitze der Wurzel: *Elodea can.*, *Myriophyllum vert.*, *Phaseolus multifl.*, *Zea mais*.

---

* Auch von Dr. Forssell mit positiv. Resultat untersucht.

Die Zellen der Vegetationsspitzen sind bekanntlich sehr reich an Plasma, die Membranen sehr dünn; es ist daher schwer mit voller Sicherheit zu entscheiden, ob die Membranen eiweisshaltig sind.

In den Membranen der die Wurzelhaube bildenden Zellen wurde keine Eiweissreaction wahrgenommen.

Cambium: Rothfärbung der Membranen durch Millon'sches Salz trat in allen Fällen ein, wo sich die Zellhäute des Weichbastes der Gefässbündel roth färbten, z. B. bei *Aucuba japonica, Astragalus verus, Carpinus Betulus. Lycopus europaeus, Lactuca muralis, Primula officinalis, Sambucus nigra, Saxifraga bulbifera. Tilia parvifolia, Urtica urens.*

Pericambium: Bei den Luftwurzeln von *Anthurium, Hartwegia comosa, Philodendron erubescens, crassinervum, pertusum.* den Bodenwurzeln von *Allium Porrum, Phaseolus multiflorus, Pisum sativum, Zea Mais.*

Phellogen: z. B. *Acer campestre, Ribes nigrum, Sambucus nigra, Solanum tuberosum.* Hier wie beim *Cambium* und *Pericambium* durchaus positive Resultate.

II. Dauergewebe.

Die Epidermisszellhäute wurden nahezu bei allen untersuchten Objecten eiweisshaltig gefunden. Die Cuticula zeigte immer die Eiweissreaction.[1] In dem nachfolgenden alphabetisch geordneten Verzeichnisse erscheinen alle Samenpflanzen aufgeführt, welche ich auf Eiweiss in den Zellhäuten der Epidermis prüfte. Da ich eben so häufig Eiweiss in den Membranen der Weichbastelemente auffand, so habe ich diese Vorkommnisse in demselben Verzeichnisse angemerkt. Auch die beobachteten Fälle des Vorkommens von Eiweiss in den Zellhäuten des Grundgewebes erscheinen darin verzeichnet.

Im Nachfolgenden bediene ich mich der folgenden Abkürzungen:

Bl. = Blatt, Blst. = Blattstiel, Cb. = Membranen des Cambiums, Coll. = Membr. des Collenchyms, Ep. = Membr. der

[1] Mulder (l. c. p. 499) beobachtete in der Cuticula immer Xanthoproteïnsäurereaction.

Epidermis, Hypd. = Hypoderma, St. = Stamm, Weichb. = Membr. des Weichbastes, Wz. = Wurzel.

Aloë sp., *vulgaris* Bl.: Die tangentialen Wände der Epidermis, die subepidermalen Zellen besonders deutlich in den Kanten.

Allium Cepa „Zwiebelschuppe" Ep. und die unmittelbar angrenzenden Schichten des Grundgewebes, Elemente des Gefässbündels (verholzt sind nur die Gefässe des Xylems); *ursinum* St., Bl.: Ep. Weichb.

Anthurium sp. Luftwz.: *velamen radicum*, *Endoderm.* Weichb.

Astragalus verus Blst.: Alle Membranen (Vanillinreaction zeigen nur Xylem und Hartbast).

Aucuba japonica Bl., Blst.: Ep. Cb. Weichb.

Bambusa stricta St.: Ep. Weichb.

Begonia Blst.: Ep. Coll. Weichb.

Bilbergia acaulis, *liboniana*, *thyrsoidea* Bl.: Ep. Hypd. Weichb.

Bromelia sphacellata Bl.: Ep. Hypd. Weichb.

Broussonetia papyrifera Blst.: Ep. Coll. Weichb.

Burettia mexicana Bl.: Ep. Weichb.

Caraguata splendens Bl.: Ep. Hypd. Weichb.

Carex Michelii, *montana*, *muricata*, *praecox*, *remota*, *stenophylla*, *tomentosa*, *vulpina* St., Bl.: Ep. Weichb.

Carpinus Betulus St.: Ep. Coll. Cb. Weichb.

Cephalanthera ensifolia, *pallens*, *rubra* St. Bl.: Ep. Weichb.

Ceratophyllum demersum St.: Alle Membranen.

Chenopodium album St.: Ep. Coll. Weichb.

Cobaea scandens St.: Ep. Weichb.

Corallorhiza innata St., Bl.: Ep. Weichb.

Cyperus alternifolius und *Papyrus* St., Bl.: Ep. Weichb.

Elodea canadensis St.: Alle Membranen.

Epipactis latifolia α. *major*, β. *minor*, *palustris* St. Bl.: Ep. Weichb.

Eriophorum angustifolium St., Bl.: Ep. Weichb.

Evonymus St.: Ep. Coll. Weichb.

Ficus elastica, *stipulata* Bl. Bst.: Ep. Coll. Weichb., ferner bei *Ficus elastica* die Anlage der Cystolithen.

Gladiolus palustris Bl., St.: Ep. Weichb.

Gymnadenia conopsea Bl., St.: Ep. Weichb.

Hartwegia comosa Bl., St., Luftwz.: Ep. Weichb. Bast. Endodermis.

Hechtia Gisebreghtii Bl.: Ep. Hypod. Weichb.
Hohenbergia strobilacea Bl.: Ep. Hypod. Weichb.
Isolepis gracilis Bl. St.: Ep. Weichb.
Juncus communis, compressus Bl., St.: Ep. Weichb.
Lactuca muralis St.: Ep. Coll. Weichb. Cb.
Lamprococcus miniatus, Weilbachii Bl.: Ep. Hypd. Weichb.
Laurus nobilis Bl.: Ep. Weichb.
Listera ovata Bl., St.: Ep. Weichb.
Lycopus europaeus St. Ep. Coll. Cb. Weichb.
Neottia nidus avis Bl., St.: Ep. Weichb.
Nidularium princeps, spectabile Bl.: Ep. Hypd. Weichb.
Nuphar luteum Blst.: Ep. Coll. Weichb.
Nymphaea alba Blst.: Ep. Coll. Weichb.
Orchis coriophora, latifolia, militaris, ustulata Bl., St.: Ep. Weichb.
Ourirandra fenestrata Bl., Blst.: Ep. Weichb.
Pellionia Deauveana St.: Ep. Weichb.
Phaseolus multiflorus St.: Ep. Weichb.
Philodendron crassinervum, erubescens, pertusum Luftwz.: Ep. Endodermis, Gefässbündelscheide, sicher die „Durchlasszellen.“ Pericb. Weichb.
Phoenix canariensis Bl.: Weichb.
Pinus silvestris Bl.: Weichb. Bast zw. den Gefässbündeln und um die Harzgänge.
Pisum sativum (Keimling) St.: Ep. Weichb. Wz.: Alle Membranen.
Pittairnia sp. Bl.: Ep. Hypd. Weichb.
Pittosporum Bl. Blst.: Ep. Coll. Cb. Weichb. Mesophyll.
Platanthera bifolia B. St.: Ep. Weichb.
Primula officinalis, Auricula St.: Ep. Cb. Weichb.
Sambucus Ebulus, nigra St. Blst: Ep. Coll. Cb. Phellogen. Weichb.
Saxifraga bulbifera St.: Ep. Cb. Weichb.
Sempervivum hirsutum St.: Ep. und angrenzende Zellen des Grundgewebes. Cb. Weichb.
Scirpus Holoschoenus, lacustris, palustris, silvaticus, triqueter Bl. St: Ep. Weichb.
Tilia parvifolia St: Ep Coll. Cb. Weichb.
Tillandsia zebrina Bl.: Ep. Hypd. Weichb.

Tradescantia zebrina, gianensis St.: Ep, Coll. Weichb. (Festigungsring schwach verholzt, mit Millon's Reagens intensiv roth).

Trinia vulgaris St.: Ep. Weichb.

Urtica dioica, urens St.: Ep. Coll. Cb. Weichb.

Vallisneria spiralis Bl.: Alle Membranen.

Vitis vinifera St.: Ep. Coll. Cb. Weichb.

Vrisea sp. Gisebreghtii, speciosa. Bl.: Ep. Hypd. Weichb.

Zea Mais (Etiol. Keimling, 3 Wochen alt) St., Bl., Cotyledon: Alle Membranen (verholzt nur die Gefässe). Wz: Tangentialwände der Gefässbündelscheide und die Membranen innerhalb dieser. (Hautgewebe verholzt.)

Die Membranen des Collenchyms zeigten Eiweissreaction z. B. bei: *Astragalus verus* Blst., *Begonia* Blst., *Broussonetia papyrifera* Blst., *Ceratophyllum demersum* St., *Chenopodium album* St., *Ficus elastica* Bst., *Lactuca muralis* St., *Lycopus europaeus* St., *Sambucus nigra* St., *Tradescantia zebrina* St., *Urtica urens* St.

In den Membranen des Grundparenchyms und des Markes habe ich selten Eiweissreaction beobachtet. Ich werde noch darauf zurükkommen.

Besondere Beachtung verdienen jene Fälle, wo alle Membranen (am Querschnitt des betreffenden Organes) die auf Eiweiss deutende Rothfärbung annahmen:

Allium Porrum, Wz.: Alle Membranen, besonders Epiblem und die Gefässbündelelemente. Vanillinreaction zeigen nur die Gefässe und die Gefässbündelscheide.

Astragalus verus Blst.: Alle Membranen, Vanillinreaction zeigen nur Xylem und Hartbast.

Elodea canadensis St.: Alle Membranen, keine Vanillinreaction.

Vallisneria spiralis Bl.: Alle Membranen, keine Vanillinreaction.

Pisum sativum (Keimling) Wz.: Alle Membranen.

Zea Mais (Etiolirte Keimpflanze, 3 Wochen alt) Cotyl, Bl., St., Alle Membranen. Vanillinreaction zeigen nur die Gefässe.

Wz.: Alle Membranen innerhalb der Gefässbündelscheide von dieser auch die tangentialen Wände. Vanillinreaction zeigten das Hautgewebe und die radialen Wände der Gefässbündelscheide.

Bei den untersuchten Ranken von *Bryonia dioica, Cobaea scandens, Cucumis sativus, Vitis vinifera* fand sich Eiweiss in den Membranen der Epidermis, des Collenchyms und des nicht verholzten Gefässbündeltheiles.

In den Membranen des Endosperms liess sich Eiweiss nachweisen bei *Asclepias syriaca, Ricinus communis*;[1] *Zea Mais*, auch Aleuron und Kleberzellen zeigten die Reaction.

Bei *Strychnos nux vomica* war nach der angewandten Methode ebenso wenig wie bei *Phoenix dactylifera* in den Zellhäuten des Endosperms Eiweiss nachweisbar. (Siehe unten p. 153.) *Agapanthus umbellatus* (Bl.), *Clivia miniata* (Bl.), *Dracaena indivisa* (Bl.), *Pandanus Veitchii* (Bl.), *Peperonia trichocarpa* (St.), *Viburnum opulus* (St.), *Yucca gloriosa, pendula* (Bl.) verhielten sich dem Millon'schen Reagens gegenüber passiv. Damit ist jedoch nicht gesagt, dass die angeführten Pflanzen in ihren Zellhäuten kein Eiweiss enthielten. Unsere mikrochemischen Methoden lassen eben noch Manches zu wünschen übrig, und wir haben es nicht ganz in unserer Hand alle störenden Factoren auszuschliesen.

In den Membranen der echten Bastzellen, so wie der Libriformzellen kann man im Allgemeinen mit Hilfe des Millon'schen Reagens Eiweis nicht nachweisen, denn eine damit eintretende Rothfärbung muss auf das aus diesen Membranen schwer zu beseitigende Vanillin zurückgeführt werden, da sich Libriformzellen wohl immer, echte Bastzellen oft als verholzt erweisen.

Idioblasten, wie die im Blatte, respective im Blatte und Stamme von *Camellia* und *Hakea*, *Nuphar* und *Nymphaea* erwiesen sich gleichfalls als verholzt.

Die Zellhäute der Endodermis (im weiteren Sinne) zeigten Vanillinreaction mindestens in den radialen Wänden. Doch liess sich Eiweiss wenigstens in den Membranen der „Durchlasszellen" immer constatiren: z. B. *Allium Porrum, Anthurium* (Luftw.), *Hartwegia comosa* (Luftw.), *Philodendron crassinervum, erubescens, pertusum* Luftw.), *Pisum sativum, Zea Mais.*

---

[1] Es empfiehlt sich, um sicher zu gehen, das Ricinusendosperm heranwachsen zu lassen.

Für den Nachweis von Eiweiss in verholzten Zellhäuten ist indess das ungleiche Verhalten des Vanillins gegenüber Phloroglucin und Salzsäure und gegenüber Millon's Reagens nicht ohne Bedeutung. Phloroglucin und Salzsäure bilden nämlich ein weitaus empfindlicheres Reagens auf das in der verholzten Wand vorkommende Vanillin, als das Millon'sche Salz.

Man kann sich davon leicht überzeugen.

Wenn man demnach in schwach verholzten Membranen mit Millon'schem Reagens weitaus stärkere Rothfärbung erhält als mit Phloroglucin und Salzsäure, so kann man diese mit Recht als Eiweissreaction in Anspruch nehmen, zumal wenn man die Färbung auch an ausgekochten Schnitten erhält. Auf diese Art konnte ich Eiweiss in den Membranen des Hypoderms aller von mir untersuchten Bromeliaceen, ferner des Xylems von *Sambucus nigra, Urtica dioica, urens*, der Bastzellen zwischen den Gefässbündeln und um die Harzgänge im Blatte von *Pinus silvestris* feststellen. Die sorgfältigste Untersuchung widmete ich den *Bromeliaceen*, deren Gewebe unter Anwendung aller Vorsichtsmassregeln und stets unter Zuziehung von Alloxan geprüft wurde, durchaus mit positivem Erfolg. Eine gleiche Sorgfalt wandte ich auch dem Collenchym und aus begreiflichen Gründen auch dem Endosperm von *Phoenix* und *Strychnos* zu. Während die untersuchten Collenchyme sich als eiweisshältig erwiesen, konnte in den Membranen der Endospermzellen von keimfähigen *Phoenix dactylifera* und *Strychnos nux vomica* kein positives Resultat erzielt werden.

Das Ausbleiben der Eiweissreaction in dem sogenannten Symplasma scheint mir wohl sehr bemerkenswerth, und verdient um so mehr hervorgehoben zu werden, als an der Plasmanatur der durch die Wand gehenden plasmatischen Verbindungsfäden niemand gezweifelt hat, obgleich zugegeben werden muss, dass ein ernstlicher Versuch Eiweiss in denselben nachzuweisen nicht unternommen wurde. (Vergl. oben pag. 138.)

Indess will ich aus dem Ausbleiben der Eiweissreaction bei den untersuchten Symplasmen nicht auf die Abwesenheit von Eiweiss schliessen. Bei Farbenreactionen können ja nebenher auftretende Körper leicht störend wirken, wofür die oben angeführten Pilzmembranen auch ein Beispiel abgeben, welche wohl

Xanthoproteïnsäure und Alloxanreaction, nicht aber die sonst so empfindliche Millon'sche Reaction geben. Ich erinnere daran, dass die so empfindliche Reichel'sche Glycerinprobe vollständig versagt, wenn neben dem Glycerin auch nur eine Spur von Zucker vorhanden ist.

Für die Plasmanatur und das Leben des Symplasmas spricht wohl sehr die Entdeckung Tangl's, dass es Wundreize fortzupflanzen befähigt ist[1].

Fassen wir alle auf den vorhergehenden Blättern angeführten Thatsachen zusammen, so finden wir, dass sich Eiweiss — nach der bei diesen Untersuchungen angewandten Methode — in den Zellhäuten aller Gewebearten nachweisen lässt.

Für die instructivsten der von mir aufgefundenen Beispiele möchte ich die untersuchten Bromeliaceen *(Bilbergia acaulis liboniana, thycsoidea; Bromelia sphacellata; Caraguata splendens; Hohenbergia strobilacea; Lamprococcus miniatus, Weilbachii; Nidularium princeps, spectabile; Pittairuia; Tillandsia zebrina; Vrisea speciosa, Gisebreghtii)*; ferner *Astragalus verus, Sambucus nigra, Urtica urens, Zea Mais*, sowie *Cladophora bombycina* und *Oedogonium* halten.

Es ist nun noch die Frage zu erörtern, ob das in der Zellhaut vorkommende Eiweiss nicht als in dieselbe infiltrirt aufzufassen ist.

Dagegen spricht jedoch schon die Entwicklungsgeschichte der Zellwand.

Die Untersuchungen Strasburger's und Wiesner's haben gelehrt, dass die erste Anlage der Wand selbst ein Protoplasmagebilde ist, auch sind die löslichen Formen der Albuminate in so geringem Grade diffusibel, dass ihr Vermögen Membranen zu infiltriren, gewiss ein geringes ist. Eiweissfrei gewordene Zellmembranen (z. B. Leinbastzellen) lassen sich mit Eiweisslösungen nicht imbibiren.

Die Eiweisskörper aber müssen wir „als eigentlich constituirende Bestandtheile des Protoplasma ansehen, sie bilden den Gipfel, das Endglied der Hauptreihe der progressiven

[1] „Zur Lehre von der Continuität des Protoplasma", Sitzb. d. kais. Akad. d. Wiss. Wien, m. n. Cl., XC. Bd., I. Abth., Jahrg. 1884, Hft. 1.

Stoffmetamorphose, denn ihre Moleeüle sind fast unzweifelhaft die grössten und an potentieller Energie reichsten, welche im Protoplasma vorkommen. Daher dürfen wir auch bei allen anderen im Protoplasma gefundenen Substanzen die Frage aufwerfen, ob dieselben etwa als Spaltungsproducte von Eiweisskörpern gedeutet werden können.[1]"

In der von Löw und Bokorny[2] angegebenen, sehr verdünnten alkalischen Silberlösung besitzen wir nun ein Mittel organisirtes, lebendes Eiweiss, Protoplasma auf chemimischem Wege zu erkennen. Tritt Reduction zu metallischem Silber ein, so deutet dies nur auf vorhandenes lebendes Protoplasma von einer gewissen Resistenz; erfolgt keine Silberabscheidung, so folgt daraus nur, dass das Protoplasma zu sensibel ist, d. h. so rasch abstirbt, dass es seine reducirenden Qualitäten nicht zur Geltung bringen kann. „Die Resistenz des Protoplasma variirt ganz ausserordentlich bei verschiedenen Organismen.[3]" „Da abgeschiedenes metallisches Silber, wenn es in sehr dünnen Schichten auftritt, das Licht auch gelb bis rothbraun und violett durchlassen kann, so erscheint statt der Schwärzung hie und da eine wechselnde Nuancirung von orange bis violett, rothbraun und grau.[4] Eine Bräunung von ganz anderem Habitus zeigt Gerbstoff oder Zucker an.

Mit der Löw-Bokorny'schen „Lösung *A*" und deren Modification für sensiblere Objecte[5] prüfte ich die obenangeführten *Bromeliaceen*, so wie *Allium Cepa*, *Zea Mais*, *Sambucus nigra*. Es mussten natürlich ziemlich dünne Querschnitte zur Anwendung gebracht werden. Dadurch wird das Dermatoplasma jedenfalls nicht reactionsfähiger gemacht, indess die Resultate waren unzweifelhaft. Die Silberabscheidung in den Membranen des Gefässbündels aller Objecte war orange bis violett und grau.

Die Membranen der Tüpfelgefässe von *Zea Mais* (Keimpflanze) wiesen Schwärzung auf. Bei den übrigen Membranen war die Reaction spärlich. Die Epidermiszellwände von *Allium*

---

[1] Reinke. Studien über Protoplasma", p. 153.

[2] „Die chem. Kraftquelle im lebenden Protoplasma," München 1882.

[3] ibid., p. 18., Anm. 2.

[4] Ibid. p. 52.

[5] Näheres bei Löw u. Bokorny, l. c. p. 51, 52.

Cepa (Querschnitte durch frische Zwiebelschuppen) erschienen grau. Diese Färbung deutet auf Eiweiss. Die gelbbraune Färbung der Membranen, welche man bei diesem Objecte auch bemerken kann, zeigt infiltrirten Zucker an.[1]

Eine Prüfung sämmtlicher genannten Objecte auf Gerbstoff (mit Eisenchlorid) ergab, dass in den Zellhäuten kein Gerbstoff vorhanden war. Zucker konnte mit der Trommer'schen Probe) ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Zellhäute der untersuchten Algen *(Spirogyra, Cladophora)* zeigten keine Silberreduction vielleicht wegen zu grosser Sensibilität. Die positiven Ergebnisse der mit den Löw-Bokorny'schen Silberlösungen angestellten Versuche sind wohl als neue Stützen der Ansicht Wiesner's, dass die in den Zellhäuten auftretenden Eiweisskörper lebendem Protoplasma angehören, zu betrachten.

---

[1] Bokorny, „Das Wasserstoffsuperoxyd und die Silberabscheidung durch actives Albumin, Jahrb. f. wiss. Bot. XVII. Bd. 1886, p. 352 (2. Heft) daselbst wird auch neuerdings der Beweis geliefert, dass nur lebendes Protoplasma die Silberabscheidung bewirkt. Vergl. ferner Löw und Bokorny l. c., p. 14.